ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIETE INTELLECTUELLE Bureau international



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIEE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT) (51) Classification internationale des brevets4: WO 85/ 02624 (11) Numéro de publication internationale: C12N 15/00, C12P 21/02 A1 (43) Date de publication internationale: 20 juin 1985 (20.06.85) C12N 1/20 // (C12N 1/20 C12R 1:19) (21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR84/00287 (74) Mandataire: WARCOIN, Jacques; Cabinet Regimbeau, 26, avenue Kléber, F-75116 Paris (FR). (22) Date de dépôt international: 5 décembre 1984 (05.12.84) (81) Etats désignés: DK, JP, US. 83/19777 (31) Numéro de la demande prioritaire: (32) Date de priorité: 9 décembre 1983 (09.12.83) Publiée Avec rapport de recherche internationale. (33) Pays de priorité: FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): TRANSGENE SA. [FR/FR]; 95, rue Saint-Lazare, F-75009 Paris (FR). (72) Inventeurs: et (75) Inventeurs/Deposants (US seulement): SONDER-MEYER, Paul [NL/FR]; 24, rue des Acacias, F-67400 Ostwald (FR). COURTNEY, Michael [GB/FR]; 18, rue du Ballon, F-67100 Strasbourg (FR). TESSIER, Luc-Henri [FR/FR]; 20, rue du Vieux Marché aux Grains, F-67000 Strasbourg (FR). LECOCQ, Jean-Pierre [BE/FR]; 6, rue du Champ du Feu, F-67116 Reichsteet (FR). (54) Title: VECTOR FOR THE CLONING AND EXPRESSION OF γ-INTERFERON, TRANSFORMED BACTE-RIA AND PROCESS FOR THE PREPARATION OF γ-INTERFERON (54) Titre: VECTEURS DE CLONAGE ET D'EXPRESSION DE L'INTERFERON-γ, BACTERIES TRANSFOR-MEES ET PROCEDE DE PREPARATION DE L'INTERFERON-γ

(57) Abstract

Disclosed is a vector for the expression of the mature protein of γ -interferon in bacteria of the type comprising the gene coding for the mature protein of human γ -interferon and the plasmidic elements providing for the expression of said gene characterized in that the end (5') of the sequence coding for the mature protein is as follows:

5' ATG TGC TAC TGT CAG GAT CCC 3'
TAC ACG ATG ACA GTC CTA GGG
Met Cys Tyr Cys Gln Asp Pro.

The hacteria transformed by said vectors enable to produce IFN-v with high yields

(57) Abrégé Vecteur d'expression de la protéine mature de l'interféron-y dans les bactéries du type comportant le gène codant pour la protéine mature de l'interféron-y humain et les éléments plasmidiques assurant l'expression de ce gène caractérisé en ce que l'extrémité 5' de la séquence codant pour la protéine mature est la suivante

5' ATG TGC TAC TGT CAG GAT CCC 3' TAC ACG ATG ACA GTC CTA GGG Met Cys Tyr Cys Gln Asp Pro.

Les bactéries transformées par ces vecteurs permettent de produire IFN-y avec des rendements élevés.

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	KR	République de Corée
ΑU	Australie	LI	Liechtenstein
BE	Belgique	LK	Sri Lanka
BG	Bulgarie	LU	Luxembourg
BR	Brésil	MC	Monaco
CF	République Centrafricaine	MG	Madagascar
CG	Congo	MIR	Mauritanie
CH	Suisse	MW	Malawi
CM	Cameroun	NL	Pays-Bas
DE	Allemagne, République fédérale d'	NO	Norvège
DK	Danemark	RO	Roumanie
FI	Finlande	SD	Soudan
FR	France	SE	Suède
GA	Gabon	SN	Sénégal
GB	Royaume-Uni	SU	Union soviétique
HU	Hongrie	TD	Tchad
JP	Japon	TG	Togo
KP	République populaire démocratique de Corés	US	Etats-Unis d'Amérique

WO 85/02624 PCT/FR84/00287

Vecteur de clonage et d'expression de l'interféron-γ, bactéries transformées et procédé de préparation de l'interféron-γ.

La présente invention concerne un procédé de préparation de l'interféron γ humain.

5

10

15

20

L'interféron y (ci-après IFN-y) est une glycoprotéine dotée in vitro d'une action anti-tumorale marquée. Il fait l'objet de nombreuses recherches au niveau pharmaceutique. Pour assurer le développement de ce produit, il convient de pouvoir le préparer en quantité importante afin d'en diminuer le prix.

En mettant en oeuvre des techniques de génies génétiques on a pu décrire la préparation de l'IFN- γ par fermentation bactérienne notamment dans la demande de brevet Européen 0077670.

Toutefois il ne semble pas que les rendements obtenus soient particulièrement intéressants, ainsi dans le brevet mentionné précédemment l'activité du milieu fermenté est de $2.5 \times 10^5 \mathrm{U}$ IFN- $\gamma/1$ ce qui est faible au niveau du rendement.

La présente invention a pour objet d'accroître le rendement de la fermentation par un facteur de 10 000 à 20 000, la quantité d'IFN-y produit atteignant 20 % (du poids total) des protéines bactériennes produites.

Pour ce faire la présente invention propose des nouveaux vecteurs.



Il s'agit de vecteur d'expression de la protéine mature de l'interféron γ dans les bactéries du type comportant le gêne codant pour la protéine mature de l'interféron γ humain et les éléments plasmidiques assurant l'expression de ce gêne caractérisé en ce que l'extrémité 5' de la séquence codant pour la protéine mature est la suivante :

5' ATG TGC TAC TGT CAG GAT CCC 3'
TAC ACG ATG ACA GTC CTA GGG
Met Cys Tyr Cys Gln Asp Pro

Le début de la séquence originale et naturelle de IFN y est la suivante (moins le codon ATG de départ) :

ATG TGT TAC TGC CAG GAC CCA

5

10

15

20

25

en la comparant avec la séquence proposée : $\overline{\text{ATG}}$ TGC TAC TGT CAG GAT CCC

on note quatre changements de nucléotides qui conservent la composition de la protéine. Dans les exemples qui suivent on démontrera que ces changements permettent de multiplier par environ 10 000 le rendement en IFN- γ en particulier lorsque l'on utilise des vecteurs tels qu'ils seront décrits ci-après.

Les vecteurs selon la présente invention comportent outre le gêne codant pour IFN avec une extrémité 5' comme indiquée précédemment :

- l'origine de réplication d'un plasmide bactérien;
- un promoteur, en particulier tout ou partie d'un promoteur du bactériophage λ : $P_{_{T}}$, $P_{_{D}}$ ou $P'_{_{D}}$,
- une région codant pour l'initiation de la traduction incorporant l'ATG de l'extrémité 5' du gêne de IFN-γ.

La présence d'une origine de réplication pour un plasmide est essentielle pour permettre la réplication du vecteur dans les cellules bactériennes correspondantes,



10

15

20

25

30

en particulier dans le cas de E. coli on utilisera, de préférence, l'origine de réplication du plasmide pBR322. Le plasmide pBR322 présente, en effet, l'avantage de donner un grand nombre de copies et ainsi d'augmenter la quantité de plasmides produisant la protéine désirée.

Parmi les promoteurs du bactériophage λ , on utilisera, de préférence, le promoteur principal de gauche noté λP_L . P_L est un promoteur puissant responsable de la transcription précoce de λ .

Il est également possible d'utiliser d'autres promoteurs du bactériophage λ , notamment le promoteur de droite, P_p ou le second promoteur de droite, P'_R .

Bien qu'il soit possible d'utiliser des séquences d'initiation de la traduction très variées, on préfère utiliser celle de la protéine cII du bactériophage λ qui sera nommée ci-après λ CIIrbs.

Comme cela sera démontré il est également possible d'utiliser de telles séquences synthétiques en particulier tout ou partie de la séquence :

ATAACACAGGAACAGATCTATG.

Le vecteur en cause comporte, en outre, de préférence une fonction d'antiterminaison de transcription codée par ex. par le gêne N de λ noté λ N. En présence du produit de transcription du gène N la transcription à partir de P_L se poursuit au-delà de la plupart des signaux stop.

Ceci écarteles problèmes posés par un arrêt prématuré de la transcription qui peuvent se produire lorsque les gènes étrangers clonés présentent de tels signaux stop. En outre, il a été démontré que l'expression à partir de P_L est améliorée dans un environnement N^{\dagger} .



10

15

20

25

30

Afin d'écarter les problèmes de toxicité et d'instabilité du système hôte-vecteur en cas de production en continu de grandes quantités d'une protéine étrangère, il est nécessaire de prévoir le contrôle de l'activité du promoteur en lui adjoignant tout ou partie d'un système d'expression inductible, en particulier thermo-inductible.

De préférence, le contrôle par la température de la synthèse de la protéine étrangère est effectué au niveau de la transcription au moyen d'un répresseur thermosensible codé dans la bactérie hôte, par exemple c1857, qui réprime l'activité de P_L à 28°C mais qui est inactivé à 42°C. Le répresseur agit sur l'opérateur O_L qui est adjacent au promoteur P_L. Bien que dans le cas précédent une partie du système d'expression thermoinductible soit partie intégrante de la bactérie hôte, il est possible de prévoir que ce système fasse partie du vecteur lui-même.

Le vecteur en cause peut également comporter un gène de résistance à un antibiotique, par exemple l'ampicilline dans le cas de pBR322, mais d'autres gènes de résistance peuvent être utilisés, résistance à la tétracycline (Tet^r) ou au chloramphénicol (Cm^r).

L'incorporation d'un tel marqueur est nécessaire pour la sélection des bactéries contenant les transformants porteurs du plasmide selon l'invention pendant les expériences de clonage.

L'incorporation d'un gène de résistance permet d'augmenter la stabilité du plasmide en imposant une pression de sélection lors de la fermentation, et en outre facilite l'isolement des transformants.



10

15

20

25

Pour le clonage il est intéressant de disposer d'un système permettant de détecter l'insertion dans un plasmide d'un ADN étranger.

A titre d'exemple, il est possible de prévoir dans la zone de clonage le fragment N-terminal de la β -galactosidase de $\underline{E.~coli}$ (lac2') en le fusionnant avec la région d'initiation de traduction dérivée de λ CII, ce qui met la traduction du fragment α sous le contrôle des séquences de CII.

Le fragment α est complémenté par l'expression du fragment ω C-terminal codé dans l'hôte, ceci conduit à une activité β -galactosidase dans les cellules. Cette activité β -galactosidase produit des colonies bleues en présence d'un substrat chromophorique, le 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactosidase.

A 28°C, le promoteur P_L est inactivé, le fragment α n'est pas synthétisé et les colonies demeurent blanches. Lorsque la température est amenée à 42°C, le promoteur P_L est activé, le fragment α est synthétisé et les colonies virent au bleu.

L'insertion d'ADN étrangers dans les sites de clonage situés dans ce système de détection empêche la synthèse de la β -galactosidase et conduit donc à des colonies blanches aussi bien à 28°C qu'à 42°C.

Il est également possible de remplacer le gène lacZ'par d'autres gènes permettant une détection.



10

15

20

25

La présente invention concerne en outre les bactéries notamment les souches de E. coli transformées par les vecteurs selon l'invention par des techniques connues et dont certaines seront rappelées dans les exemples.

Enfin l'invention concerne un procédé de préparation de IFN-y humain dans lequel on cultive sur un milieu de culture des bactéries transformées comme décrit précédemment et dans lequel on récupère ensuite l'IFN-y formé.

Les milieux de culture mis en oeuvre sont connus de l'homme de métier et devront être adaptés à chaque souche cultivée. La culture sera de préférence effectuée en présence de l'antibiotique à l'encontre duquel la souche transformée est devenue résistante.

- IFN-γ est séparé après éclatement des cellules par des techniques connues comme la séparation sur colonne d'affinité ou la chromatographie d'exclusion.

La présente invention comporte, bien entendu, d'autres aspects, notamment certains plasmides qui seront décrits dans les exemples ainsi que leurs mutants et dérivés et de façon générale les procédés de fermentation des bactéries transformées ainsi que l'IFN-γ ainsi obtenu.

D'autres caractéristiques et avantages de l'invention seront mieux compris à la lecture des exemples ci-après et des dessins ci-annexés sur lesquels :

- la figure 1 représente la stratégie permettant de préparer le plasmide pTG907,
 - la figure 2 représente la stratégie permettant de préparer le phage M13tg910,
 - la figure 3 représente la structure du phage M13tg910,
- la figure 4 représente la stratégie permettant de préparer le plasmide pTG908,
 - la figure 5 représente la séquence complète du gène codant pour IFN-γ isolé à partir de la banque,
- la figure 6 représente la stratégie de préparation de pTG909,



- la figure 7 représente la stratégie de préparation de pTG941,
- la figure 8 représente la stratégie de préparation de pTG951.

Il convient de remarquer que les différentes séquences de nucléotides figurant dans les dessins doivent être considérées comme faisant explicitement partie de la présente description, ces séquences n'ont pas été reproduites dans le corps du texte afin de ne pas l'alourdir inutilement.

1) Procédés généraux

a) Souches bactériennes

Les souches bactériennes utilisées dans le cadre de la présente invention sont les suivantes :

- . TGE900 qui est une souche de <u>E. coli</u> ayant les caractéristiques suivantes : su F his ilv bio (λ cI857 Δ Bam Δ HI)
- . N6437, souche de <u>E. coli</u> ayant les caractéristiques suivantes : F his ilv gal $^+$ $\Delta 8 \text{proC}^+$: tn10 lac Δ m15 (λ cI857 Δ B am Δ HI).
- . Jm103 qui est une souche de <u>E. coli</u> ayant les caractéristiques suivantes : Δ (lac-pro) sup^E thi endA sbcB15 sttA rK⁻ nK⁺ / F¹ traD36 proAB⁺ laci^a lacZ Δ m15.

Les souches mentionnées précédemment ont été utilisées parce qu'elles étaient disponibles, mais il est bien entendu qu'il est possible d'utiliser d'autres souches dans la mesure où elles présentent certaines caractéristiques essentielles qui sont rappelées dans le cours de la description détaillée.

b) Préparation des ADN

Des mini-préparations d'ADN de plasmides ou de phages M13 sont effectuées comme cela est décrit par Ish-Horowitz (référence 1) à la seule différence que l'ADN est précipité une seconde fois avec de l'éthanol avant d'être utilisé.



20

5

10

15

25

Les maxi-préparations sont effectuées comme cela est décrit dans la publication précédente, avec une purification complémentaire par un gradient de densité CsCl/bromure d'éthidium.

c) Techniques de clonages

Le traitement des ADN avec des enzymes de restriction est effectué, sauf indications contraires, en utilisant les conditions indiquées par le fabricant (New England Biolabs, Bethesda Research Laboratories et Boehringer Mannheim).

Lorsque cela est nécessaire, les phosphates des extrémités 5' sont éliminés en utilisant, soit une phosphatase alcaline bactérienne, soit une phosphatase d'intestin de veau, pendant 30 minutes à 37°C dans le tampon d'enzyme de restriction.

La réparation des extrémités cohésives utilisant la polymérase de Klenow (Boehringer Mannheim) est effectuée à 25°C pendant 15 minutes dans un mélange de 50 mMol. Tris HCl, pH 7,8,5 mMol. MgCl₂, 10 mMol. de β-mercaptoéthanol, 0,4 mMol. de dNTPs avec l'enzyme et 10 à 200 μg/ml d'ADN.

La nucléase S_1 (Miles) est utilisée à 2 $u/\mu g$ d'ADN à 25°C pendant 30 minutes dans un milieu 0,3 Mol. NaCl, 0,03 Mol. NaCl, pH 4,8, 0,003 Mol. ZnCl₂.

Bal31 est utilisée selon le procédé de Panayotatos et al. (référence 2). Les ligations sont effectuées à $15\,^{\circ}$ C (sauf lorsque cela est indiqué différemment) pendant 4 à 24 heures en utilisant de l'ADN ligase T_A



25

20

5

10

(Boehringer Mannheim) avec 100 mMol. de NaCl, 66 mMol. de Tris HCl, pH 7,5, 10 mMol. de MgCl₂, 0,5 mMol. de spermidine, 0,2 mMol. de EDTA, 2 mMol. de DTT, 1 mMol. d'ATP, 0,1 mg/ml de BSA et 5 à 50 µg/ml d'ADN.

Pour la ligation d'extrémités cohésives, on utilise environ 30 unités/ml de ligase. Pour la ligation des extrémités franches on utilise environ 100 unités/ml de ligase.

Entre les différentes réactions enzymatiques, des échantillons d'ADN sont extraits avec un mélange phénol/chloroforme puis précipités à l'éthanol. Lorsque cela est nécessaire, du tARN de <u>E. coli</u> ou de levures est utilisé comme entraîneur. Les adaptateurs moléculaires (Collaborative Research, Bethesda Research Laboratories, New England Biolabs) sont préhybridés et utilisés en excès molaire de 10 à 50 fois pour les extrémités franches d'ADN utilisant les conditions de tampon décrites précédemment avec 100 unités/ml de ligase T₄ à 4°C pendant 15 heures. Lorsque l'on utilise des adaptateurs non phosphorylés, les adaptateurs qui n'ont pas réagi sont éliminés directement après ligation par précipitation avec le tétrachlorhydrate de spermine (Hoopes et al. - référence 3).

Lorsque l'on utilise des adaptateurs phosphorylés, le mélange de ligation est tout d'abord extrait avec un mélange phénol/chloroforme puis précipité avec de l'éthanol avant commure spécifique avec les enzymes de restriction appropriées puis précipitation avec le tétrachlorhydrate de spermine.

Les cellules bactériennes compétentes sont préparées puis transformées avec les plasmides ou transfectées par l'ADN de M13 selon les procédés décrits par Dagert et Ehrlich (référence 4).



5

10

15

20

25

EXEMPLE 1

La préparation du pTG908 implique tout d'abord la préparation d'un plasmide comportant :

- l'origine de réplication de pBR322,
- le gêne de résistance à l'ampicilline de ce même $plasmide\left(amp^{R}\right)$,
- le promoteur P_{τ_i} et le gène λN .

1) Suppression du site PstI dans pBR322

toutefois, celui-ci présente l'inconvénient d'avoir à l'intérieur du gène amp^R un site de restriction PstI, car un site de même nature sera utilisé par la suite dans la zone de clonage comme site unique de restriction. Il convient donc de faire disparaître ce site de restriction PstI en utilisant un mutant du plasmide pBR322, le plasmide pUC8, dans lequel le gène de résistance à l'ampicilline ne présente pas de site de restriction PstI (ce site a été éliminé par mutation in vitro). pBR322 est commercialisé notamment par Bethesda Research Laboratories et pUC8 est décrit dans l'article référencé 5.



10

15

20

25

30

Pour ce faire, on échange le fragment PvuI/PvuII de 1 669 bp de pBR322 avec le fragment analogue PvuI/PvuII du plasmide pUC8. Afin de réaliser cet échange les plasmides pBR322 et pUC8 sont traités successivement par PvuI, PvuII, puis circularisés par section d'une ligase.

On obtient ainsi le plasmide pTG902 qui ne présente plus de site de restriction PstI et qui a également perdu le site de restriction NdeI présent à l'origine sur pBR322 (non représenté sur la fig. 1). En outre, le plasmide pTG902 porte un fragment de 50 bp correspondant à la séquence laci' dans lequel se trouve le site PvuII.

2) Insertion du promoteur P_L et du gène λN et préparation du plasmide de pTG907

Le promoteur P_L et le gène λN sont isolés du plasmide pKC30 pour être insérés dans pTG902, le segment prélevé contient également l'opérateur O_L sur lequel agira le répresseur thermosensible cI850, comme cela sera décrit dans les essais. En outre, le procédé permet de supprimer les sites EcoRI et HindIII tout en conservant un site unique BamHI en aval du gène N pour pouvoir ensuite insérer λ cIIrbs. Le plasmide de pKC30 est décrit dans la référence 6.

pTG902 est coupé en son site de restriction unique EcoRI et les extrémités 5' sortantes sont éliminées par traitement à la nucléase S_1 . Après une digestion avec BamHI, le fragment le plus important est purifié sur gel.



10

15

20

25

30

Le fragment portant le promoteur P_L et le gène λN est préparé de la même façon à partir de pKC30 en traitant successivement le plasmide par PvuI, la nucléase S_1 et BamHI. Les fragments, après purification sur gel, sont soumis à l'action de la ligase, ce qui conduit à la fusion EcoRI/PvuI et à la reconstitution du site BamHI.

Le mélange de ligation est utilisé pour transformer des cellules hôtes compétentes, TGE900, à 30°C. Cette souche contient le prophage λ délété, λ cI857 Δ Bam Δ HI, qui fournit le répresseur de λ thermosensible,cI857, qui est nécessaire pour bloquer la transcription à partir de P.

Ceci est important car l'activité de P_L dans un milieu N^+ est léthale compte tenu de la fonction d'antiterminaison de N.

Après analyse par enzymes de restriction, les clones contiennent des plasmides de structure correcte et sont ensuite testés pour leur manque de viabilité à 42°C.

L'un des plasmides obtenus, pTG906, est traité de façon à éliminer le segment PvuII-SalI de manière à supprimer les sites de restriction compris sur ce segment et afin de faire disparaître également les deux sites de restriction extrêmes. Pour ce faire, pTG906 est traité successivement avec SalI, la nucléase S₁, PvuII et la ligase.

On obtient ainsi le plasmide pTG907 qui comporte l'ensemble des éléments évoqués au début de cette étape et, en outre, qui est Pst Eco Hind Sal Ava Nde PvuII. La synthèse de ce plasmide est représentée sur la figure 1.



10

15

20

25

30

3) Clonage de la région AcIIrbs

La seconde phase importante de la synthèse consiste à insérer la région λ cIIrbs sous forme d'un fragment λ vaI/TaqI dans le début du gène lacZ' (fragment α de la β -galactosidase) lequel a été cloné dans le phage M13 nommé M13tg110. Cette stratégie permet un test fonctionnel simple pour rbs, à savoir la production de la protéine lacZ' et, par conséquent, d'obtenir des plaques bleues en présence d'IPTG et de Xgal ; ceci permet également un séquençage rapide de la construction en utilisant la méthode dite du didéoxy.

Dans le cours des expériences, différents dérivés du phage M13 seront mentionnés. Précédemment on a mentionné le phage M13tg110 et dans la suite de la description on utilisera d'autres phages du même type dont la construction va être rappelée ci-après.

La construction de ces vecteurs est indiquée dans le tableau I ci-après sur lequel figurent les références du phage de départ, la nature de l'enzyme de restriction avec laquelle il a été découpé, le traitement particulier qu'ont subi les fragments ainsi obtenus et la nature de l'insert qui a été fixé dans les sites ainsi révélés.

Le phage M13mp7 est commercialisé notamment par la société Bethesda Research Laboratories.

M13mp701 est obtenu à partir de M13mp7 par remplacement du fragment PstI/EcoRI à droite (CTG CAG ... GAA TTC) par la séquence : CTG CAG CAA TTC.

Le principe de la construction est décrit dans le schéma suivant :



ATG ACC ATG ATT ACG AAT TOO CCG GAT CCG TCG ACC TGC AGC AAT TCA CTG GCC M13mp701

Bam HI

ATGACCATGATTACGAATTCCCCG

GATCCGTCGACCTGCAGCAATTCACTGGCC

TACTGGTACTAATGCTTAAGGGGCCTAG

GCAGCTGGACGTCGTTAAGTGACCGG

DNA polymerase

ATGACCATGATTACGAATTCCCCGGATC

GATCCGTCGACCTGCAGCAATTCACTGGCC

TACTGGTACTAATGCTTAAGGGGCCTAG

CTAGGCAGCTGGACGTCGTTAAGTGACCGG

Linker HindIII

ATGACCATGATTACGAATTCCCCGGATCCCAAGCTTGG CCAAGCTTGGGATCCGTCGACCTGCAGCAATTCACTGGCC

TACTGGTACTAATGCTTAAGGGGCCTAGGGTTCGAACC GGTTCGAACCCTAGGCAGCTGGACGTCGTFAAGTGACCGG

HindIII

ATGACCATGATTACGAATTCCCCGGATCCCA TACTGGTACTAATGCTTAAGGGGCCTAGGGTTCGA

AGCTTGGGATCCGTCGACCTGCAGCAATTEACTGGCC

ACCCTAGGCAGCTGGACGTCGTTAAGTGACCGG

 T_4 DNA ligase

ATG ACC ATG ATT ACG AAT TOO COG GAT COD AAG CIT GGG ATD CGT CGA CCT GCA GCA ATT CAC TGG CC

Eco RI Bam HI Hird III Bam HI Sal I PstI



TABLEAU I

					Phase	Phase	Phase	
Nom	Phage parental	clivage	Traitement	Insert	de de HindIII BamHI	de BamHI	de PstI	tation de lacα +/-
M13mp701	M13mp7	Construction	Construction D.R. Bentley		0	н	H	•
M13tg102	M13mp701	Accī	ADN polymérase	séquence HindIII(a)	H	H	H	•
M13tg110	M13mp701	Acci	S, nucléase	séquence HindIII(a)	III	H	11	ı
M13tg115	M13tg110	EcoRI	S, nucléase,	séquence BglII (b)	11	111	H	•

Adaptateur de séquence HindIII phosphorylé CCAAGCTTGG Adaptateur de séquence BglII non phosphorylé CAGATCTG **B** 9



10

15

20

25

Les protocoles d'utilisation des enzymes (restriction, ADN polymérase, T₄ADN ligase) sont ceux indiqués dans les notices des fournisseurs. Le "linker" HindIII est un oligonucléotide synthétique de séquence 5' CCAAGCTTGG 3' (Collaborative Research Inc., Waltham, Mass O2154, E.U.A.).

La région cIIrbs est isolée à partir d'un plasmide pOG11 (réf 7) qui contient un fragment de \(\lambda \text{HaeIII/Sau3A} \) qui s'étend du milieu du gène cro jusqu'au milieu de la région codant pour cII (cro et cII étant impliqués notamment dans la régulation de la lysogénie du bactériophage \(\lambda \).

On prélève dans pOG11 le fragment AvaI/TaqI de 186 bp contenant la région cIIrbs et on le traite avec la polymérase Klenow. D'autre part, on traite le phage M13tg110 par BamHI puis par la polymérase de Klenow suivi d'un traitement à la phosphatase intestinale de veau. Les fragments obtenus sont soumis à l'action de la ligase T₄.

Un examen des séquences du fragment de pOG11 comportant la région cIIrbs et du phage M13tg110 permet de prévoir que l'insertion du fragment portant cIIrbs dans le site BamHI de M13tg110 doit conduire à l'obtention de plaques bleues après fermentation des bactéries transfectées compte tenu du fait que le gène lacz' est en phase pour la traduction à partir de AUG du gène de cII, tandis que les plaques correspondant à la souche parentale M13tg110 sont blanches.



10

15

20

25

30

Les plaques bleues sont crélevées puis les colonies sont sélectionnées par analyse de restriction enzymatique des minipréparations et l'on vérifie ensuite par séquençage que la construction obtenue est correcte.

On obtient ainsi un clone résultant M13tg910 dont la structure globale est représentée à la partie inférieure de la Figure 2 et la structure détaillée est représentée à la figure 3.

On constate que l'insertion du fragment cIIrbs reconstruit en amont les sites BamHI et AvaI et en aval le site BamHI.

La traduction à partir de AUG de cII conduit à la fusion des 13 aminoacides terminaux de cII aux 8 aminoacides du NH₂ terminal de la protéine lacZ'.

Insertion du fragment λcIIrbs dans le plasmide pTG907

La troisième étape de cette synthèse consiste à transférer le fragment cIIrbs/lacZ' du phage M13tg910 sur le plasmide vecteur pTG907 préparé précédemment.

Pour ce faire, il convient tout d'abord d'éliminer les sites EcoRI, BamHI et AvaI en amont de cIIrbs puis d'insérer un site BglII.

Dans ces conditions, cIIrbs peut être prélevé sous forme d'un fragment BglII-BglII et placé dans le site BamHI en aval du promoteur P_L et du gène λN de pTG907.

Le phage M13tg910 est digéré avec EcoRI puis traité avec Bal31 puis ensuite par la polymérase de Klenow. Les fragments obtenus sont alors soumis à l'action de la ligase en présence d'adaptateurs BglII non phosphorylés. Le mélange de ligation obtenu est utilisé pour transformer des cellules compétentes JM103.



On sélectionne alors les plages bleues. Ces clones sont ensuite analysés afin de vérifier qu'ils contiennent le site BglII et qu'ils ne présentent plus de site EcoRI ou BamHI en amont. On obtient ainsi des clones tels que M13tg912 dont la structure est représentée sur la figure 4.

Le traitement par Bal31 a produit une délétion de 101 bp éliminant les sites EcoRI, BamHI et AvaI; ainsi que les séquences de lac ATG et lac Shine/Dalgarno. Le site BglII introduit se trouve placé enrion 100 bp en amont de l'ATG de cII et 10 bp en aval de Plac.

Le fragment BamHI/SphI de pTG907, le fragment BglII/HgaI portant cIIrbs et lac2' et l'adaptateur phosphorylé ont été préhybridés dans un rapport molaire de l:2:1 puis traités avec la ligase T_4 . Des aliquots sont utilisés pour transformer les cellules compétentes de la souche 6150 à 30°C.

Les cellules intéressantes sont identifiées en sélectionnant les transformants avec un fragment cIIrbs/lacZ' marqué au P³² et la construction obtenue est confirmée par une étude de restriction enzymatique.

Afin d'avoir une première indication montrant que les différents éléments du système d'expression se conduisent comme cela est désiré, le plasmide obtenu, pTG908, est transféré dans une souche hôte N6437 qui possède à la fois c1857 et le fragment ω de la β -galactosidase complémentant le fragment α qui est codé par le plasmide.

Les transformants obtenus placés sur une boîte contenant IPTG + Xgal sont blancs à 28°C puis virent au bleu environ 30 minutes après lorsqu'on les transfère à 42°C.



20

15

5

10

10

15

20

25

30

EXEMPLE 2 : Sélection du clone de cDNA de IFN-γ humain

On réalise selon les procédés connus une banque de CDNA à partir des mARN de lymphocytes induits par des agents mitogènes.

Puis on sélectionne un clone comportant la séquence codant pour IFN-y complet (figure 5) ce clone est dénommé pTG11.

IFN-y est synthétisé sous forme d'un prépeptide dont la séquence signal de 20 amino-acides est scindée pour donner le polypeptide mature qui débute par la séquence cys-tyr-cys et couvre les amino-acides 21 à 166.

L'analyse de la séquence des nucléotides pour les sites de restriction révèle un site <u>Eco</u>RII à 8 bp en aval du départ de la protéine mature et un site <u>Sau</u>3A à 285 bp en aval du codon stop, ce qui permet d'isoler pratiquement toute la séquence codant pour la protéine mature sur un fragment <u>Eco</u>RII/Sau3A.

EXEMPLE 3 : Construction de pTG909 plasmide expirant faiblement IFN-γ humain

La figure 6 schématise la préparation de pTG909.

On utilise tout d'abord une molécule d'adaptation synthétique qui permet :

- a) d'effectuer la jonction entre les extrémités <u>Eco</u>RII et NdeI,
- b) d'introduire les 8 bp manquantes par rapport à la séquence codant pour IFN-y mature et,
- c) de reconstituer le codon de départ ATG de <u>cII</u>rbs de façon que la séquence codant pour la protéine IFN-y mature soit traduite sans amino-acides fusionnés à l'exception de l'initiateur F-met.



10

15

20

25

Cet adaptateur est synthétisé chimiquement et sa constitution est représentée sur la figure 2.

pTG11 est mis en digestion avec EcoRII et Sau3A et pTG908 avec NdeI et BamHI.

Les fragments appropriés sont purifiés sur gel, mélangés avec une quantité équimolaire de l'adaptateur, préhybridés et ligés. Le mélange est utilisé pour transformer des cellules compétentes TGE900 et les transformants sont sélectionnés en hybridant un insert PstI de pTG11 "nicktraduit" et marqué au p³² avec les transformants.

13 clones sont sélectionnés et contrôlés par cartographie et l'un d'eux pTG909 est vérifié par séquençage.

La mise enculture du clone de TG900 transformé par TG909 es effectuée sur un milieu LB avec 50 µg/ml Ampicilline jusqu'à une densité optique ${\rm DO}_{660}=0.3$ (~ 10^8 cellules/ml) et induite pendant 1 heure à 42°C. Les extraits sont préparés pour tester leur activité IFN- γ selon des procédés connus :

Les résultats montrent une activité de 10⁵ unité/l de culture en IFN-y. Le poids moléculaire de la protéine d'environ 17000 dalton est en bon accord avec ce que l'on sait de IFN-y.

Mais cette activité correspond à environ 0,001 % du contenu total en protéine de la cellule.

C'est ce résultat qui a amené à réétudier la structure fine des bases au voisinage de codon de départ et à proposer des mutations ponctuelles conservatrices permettant d'améliorer le rendement en IFN-y.



10

15

20

25

30

EXEMPLE 4 : Construction du vecteur pTG941

pTG909 contient 2 sites NdeI, l'un au codon de départ de IFN- γ et l'autre 22 bp plus tard dans la séquence IFN- γ (voir figure 7).

La région entre ces sites qui est la région codant pour les 7 premiers amino-acides de IFN-y a été éliminée par traitement avec <u>Nde</u>I et remplacée par un oligonucleotide synthétique qui est représenté sur la figure 7.

Cette réaction détruit le site NdeI aval et reconstitue le site NdeI amont tout en introduisant un site BamHI qui est unique.

Ce changement de base est conservateur, c'est-à-dire que la séquence d'amino-acide n'est pas altérée.

Les extraits obtenus dans les mêmes conditions que précédemment à partir de souche transformée par le plasmide pTG941, contiennent 2 x $10^9 \text{U}/1$ IFN- γ .

Ce résultat est 10 000 fois supérieur aux résultats obtenus avec pTG909 et correspond à 10 % du poids total des protéines cellulaires produites.

EXEMPLE 5 : Construction de pTG951

La figure 8 schématise la construction de pTG951 qui est un dérivé de pTG941 dans lequel un fragment contenant le cIIrbs a été remplacé par une séquence synthétique sur la base de la séquence de la région d'initiation de la traduction de l'opéron E. coli lac noté E. coli lac opéron rbs. Cet oligonucléotide synthétique a été inséré entre le site unique NdeI du codon de départ de la séquence codant pour IFN-y et le site ClaI qui a été inséré au niveau du site HgaI dans le gène N. De ce fait par traitement avec NdeI et ClaI le plasmide pTG951 ne contient plus qu'un gène N tronqué (un codon step en phase avec la traduction du gène N est placé immédiatement en amont du nouveau site rbs) et est dépourvu des terminateurs de

10

15

de transcription tL1 et tR1 présents dans pTG909 et pTG941.

Les extraits bactériens obtenus à l'aide de bactéries transformées par pTG951 conduisent à une production de 5 x 10^9 IFN- γ U/l de culture, ce qui correspond à 25 % du poids total des protéines cellulaires produites.

Le site rbs synthétique de pTG951 contient un site <u>Bgl</u>II unique immédiatement avant le codon de départ, il est donc possible de faire des dérivés de pTG951 par scission avec <u>Bgl</u>II suivi par diverses manipulations utilisant soit l'ADN polymérase I ou la nucléase S1. Ces dérivés présentent des variations dans la distance et les séquences entre la séquence de Shine/Dalgarno et l'ATG. Mais aucun des plasmides ainsi préparé ne présente une activité supérieure au pTG951 lui-même.

Les principaux résultats sont rappelés dans le tableau ci-après :



NOM	PROMOTEUR	RBS	SEQUENCE DE RBS ET JONCTION AVEC LA SEQUENCE IFN UIFNY/1 % PROTEINE
pTG909	Jd	cII	fmet cys tyr cys gln asp pro tyr TAAGGAAGTACTTACATATG TGT TAT TGC CAG GAC CCA TAT $10^5 \mathrm{u}$ Detecte
pTG941	PL	cII	fmet cys tyr cys gln asp pro tyr TAAGGAAGTACTTACATATG TGC TAC TGT CAG GAT CCC TAT 2 x 10^9 U > 10 %
pTG951	PL	SYNTH (lac)	fmet cys tyr cys gln asp pro tyr SYNTH CACAGGAACAGAGATCTATG TGC TAC TGT CAG GAT CCC TAT 5 x 10 ⁹ U >10 % (lac) BglII
			TABLEAU
	:		



Bibliographie

- Ish-Horowitz D. et Burke J.F., Nucl. Acids Res. 9, 2989-2998 (1981).
- Panayotatos N. et Trong K., Nucl. Acids Res. 9, 5679-5688 (1981).
- 3. Hoopes B.C. et McClure R.R., Nucl. Acids Res. 9, 5493-5504 (1981).
- 4. Dagert M. et Ehrlich S.D., Gene, 23-28 (1979).
- 5. Vieira J. et Messing J., Gene 19, 259-268.
- 6. Shimatake H. et Rosenberg M., Nature, 292, 128-132, (1981).
 - 7. Oppenheimer A.B., Gottesman S. et Gottesman M., J. Mol. Biol., 158, 327-346 (1982).



15

20

25

REVENDICATIONS

1. Vecteur d'expression de la protéine mature de l'interféron γ dans les bactéries du type comportant le gène codant pour la protéine mature de l'interféron γ humain et les éléments plasmidiques assurant l'expression de ce gène caractérisé en ce que l'extrémité 5' de la séquence codant pour la protéine mature est la suivante : 5' ĀTG TGC TAC TGT CAG GAT CCC 3'

TAC ACG ATG ACA GTC CTA GGG Met Cys Tyr Cys Gln Asp Pro

- 2. Vecteur de clonage selon la revendication l caractérisé en ce qu'il comporte en outre :
 - a) l'origine de réplication d'un plasmide bactérien,
 - b) un promoteur,
 - c) une région d'initiation de la traduction comportant le codon ATG de la séquence codant pour IFN- γ mature.
 - 3. Vecteur selon la revendication 2 caractérisé en ce qu'il comporte :
 - a) l'origine de réplication d'un plasmide bactérien,
 - b) un promoteur du bactériophage λ , P_L , P_R ou P_R ,
 - c) une région d'initiation de la traduction choisie parmi tout ou partie $\lambda cIIrbs$ ou une séquence synthétique placée sous le contrôle du promoteur du bactériophage λ .
 - 4. Vecteur selon la revendication 2 caractérisé en ce que la région d'initiation de la traduction est λ CIIrbs.
 - 5. Vecteur selon la revendication 2 caractérisé en ce que la région est constituée par tout ou partie de la séquence :

ATAACACAGGAACAGATCTATG.



15

- 6. Vecteur selon l'une des revendications l à 5 caractérisé en ce que le promoteur utilisé est le promoteur $\mathbf{p}_{\mathrm{r.}}$.
- 7. Vecteur selon l'une des revendications 1 à 6 caractérisé en ce qu'il comporte, en outre, une fonction d'antiterminaison de transcription.
- 8. Vecteur selon la revendication 7 caractérisé en ce que la fonction d'antiterminaison de transcription est le gène λN .
- 9. Vecteur selon l'une des revendications 1 à 8 caractérisé en ce qu'il comporte l'origine de réplication de pBR322.
 - 10. Vecteur selon l'une des revendications 1 à 9 caractérisé en ce qu'il comporte un gène codant pour la résistance à un antibiotique.
 - 11. Vecteur selon la revendication 10 caractérisé en ce qu'il comporte un gène de résistance à l'ampicilline.
 - 12. Les plasnides vecteurs pTG941 et pTG951 ainsi que leurs mutants et dérivés.
 - 13. Bactéries transformées par un vecteur selon l'une des revendications 1 à 12.
 - 14. Bactéries selon la revendication 13 caractérisé en ce qu'il s'agit de E. coli.
- 15. Procédé de préparation d'interféron γ humain
 25 caractérisé en ce qu'on a cultivé sur un milieu de culture une
 bactérie selon l'une des revendications 13 et 14 et en ce que
 l'on isole IFN-γ humain obtenu après culture.



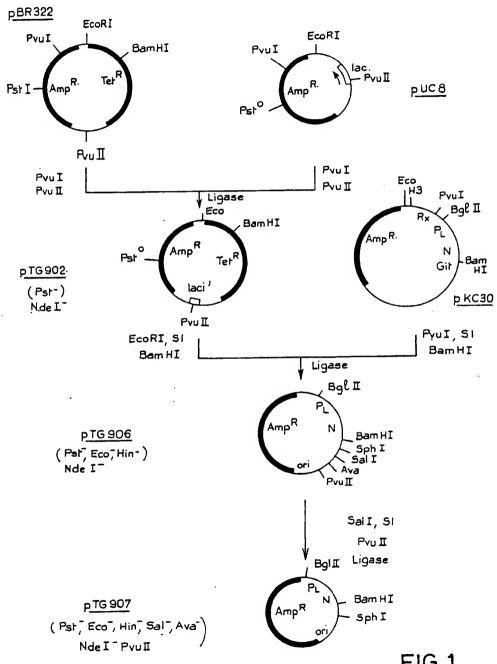
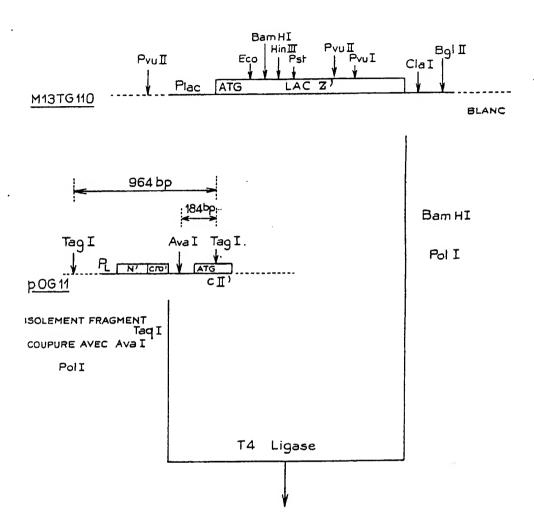
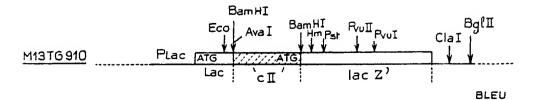


FIG.1





FIG_2

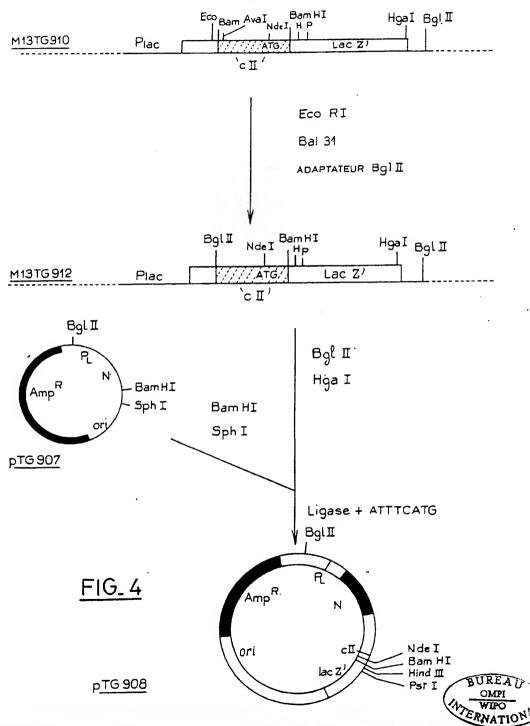


120 CGCTG GCGAC	GTGAGCGCAA CACTCGCGTT	360 TATGA	480 ATGC	600 AATTC TTAA6	CTAGC CTAGC	840 CNGTCGTCG1 GKCAGCAGCA	960 CICAL GAGIL	1080 AAATA	Cla II 200	3.3
120 CGTCTCGCTG GCAGAGCGAC	GTGAGCGCAN CACTCGCGTT	ACABC	16616 A 160 ACCACATACG	P.E.T.	Puzo GCACCGALCS CGTGGCTAGC		960 ACTCGUTCAL TGAGCGAGTD	1080 TAACAAAAAA A1 161 11161	Cla II 200 Catcon Ter	
110 216 T 100 34 C A A C G G	230 AAABCGGGCA 17TCGCCGT	350 CACAGGAA 31610011	470 SACACCIA STGTUGGAT	III 590 I	710 Gaababbeec Ctteteebb	830 GAGGCCGARA CTCCGGCTRT	950 ACGGGTTGTT TGCCCAACAA	1070 ACGCGAATTT TGCGCTTAAA	1190 GATTACCETT CTAATGGCAA	23
100 Pu II	220 166 AA	40 11 CA	460 TAK AC	8011 BC	00 6C 6A C6 CT	820 CCT GAI GGA CTI	940 CCG ACI	1060 TITA ACI	80 AC GA: TG C:	13
AAGGGCAA TTCCCGTT	TCCCGACT AGGGCTGA	ATAACAAT	ATCAAATT TAGITIAA	AME BICC TAGGCAGG	700 GCGTAATAGC CGCATTATCG	820 CGATCTTCCT GCTAGAAGGA	GGAGAAT	1060 CAAAAATITA GTTTTTAAAT	1180 CTAGITTIAC GAICAAAAIG	
CCAGGCGGTG AAGGGCAATC AGCTGTTGCC GGTCCGCCAC TTCCCGTTAG TCGACAACGG	210 220 220 CGACAGGT TCCCGACTGG AAAGCGGGCA TGCTGTCCAA AGGGCTGACC 1717CGCCCGT	330 TTGTGAGCGG	450 460 CAAAAAGGE ATCAAATTAA ACCACACCTA	570 10-00-00-00-00-00-00-00-00-00-00-00-00-0	Pude Tegesagets Accostocas	800 810 CCGGAAAGCT GGCTGGAGTG GGCCTTTCGA CCGACCTCAC	930 AATCCBCCBT TIGITCCCAC TTAGGCGGCA AACAAGGGTG	1050 GCTGATTTAA CGACTAAATT	1170 GATTGACATG CTAACTGTAC	TTTATCA RARIAGI
20 30 90 100 Pu II 110 Pu	190 $ \begin{array}{ccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	280 290 300 310 Pec 22-3 330 350 350 350 CGGCCCCAG GCTTTACACT TITACACT TITACACT TO CGGCGCGG GTAACAATT CACACAGGGA ACAGCTATATA CACACAGGGA ACAGCTATATA CGGAAATGTGA ACAGCTATATA ACAGCTATATA TACACAGGGA ACAGCTATATA ACACTCGCC TATIGITAA GTGTGTCCTT TATACATATATATATATATATATATATATATATA	110 420 420 420 10 430 10 430 10 440 450 460 450 460 470 10 10 10 10 10 10 10 10 10 10 10 10 10	AACGAGGCTC TIGCTCCGAG	6 CATCCCCCT GTAGGGGGGA	800 CCGGAAAGCT GGCCTTTCGA	870 880 27 890 920 920 930 920 920 920 920 920 920 920 920 920 92	1040 TAAAAAATGA ATITTTACT	1160 GGGTACATAT CCCATGTATA	1280 CCGGCATGAA BBCCGTACTT
70 116C16CAAC AACGACG116	190 GATTCATTAA CTAAGTAATT	310 GGCTCGTATG CCGAGCATAC	400 AACABAGAAA CAACAGGATA AATAACCCG CTCTTACACA TICCABCCCT ITETTITITI STIGLEGIAI TIATIGGGG GAGAATGIGI ABGTCGGBA	SS. 550 AAACAAACGC TIGITIGEG	670 CCTTGCAGCA GGAACGTCGT	HARSE 770 780 790 CGAATGGGGG TITGGGGAGC ABAAGCGGTG GCTTACCGGG AAAGGGAGCA AAGGCGGTG TCTTCGCCAC	880 890 900 10CCCCATC TACCCATC CATTACGUTC ACCCGGGTAG TATACGATC ATTGGATAGG TAATCCAG	1030 TCCTATTGGT AGGATAACCA	1150 TTATCAACCG AATAGTTGGC	1270 BCTACCCTCT CGATGGGAGA
CGTGGACCGC GCACCTGGCG	Nar I / 4964 1.60 1.60 1.70 4.2 1.80 66565CCAAT ACGCAAACCG CCTCTCCCGG CGCGTTGGCC CCGCGGGGGG GCGCAACCGG	300 TTATGCTTCC AATACGAAGG	420 AATAACCCCG TTATTGGGGC	AGETTEGES ACCAAGCAGG	660 AACTTAATCG TTGAATTAGC	780 TTCCGGCACC AAGGCCGTGG	900 TAACCTAICC ATTGGATAGG	1020 1164166661 AACTACCGCA	1130 1GTTTTTGGG GCTTTTCTGA TTATCAACCG ACAAAAACCC CGAAAAGACT AATAGTTGGC	1240 Gett 1260 1260 CIBAIGGET TIBIAGAIET CICABABATA BACTAICGGA AACATCTAGA GAGIITITAT
ACAGGATIT CGCCTGCTGG GGCAACCAG TGTCCTAAAA GCGGACGACC CCGTTTGGTC	cereteces	290 GCTTTACACT CGAAATGTGA	410 CAACAGCATA GTTGTEGTAT	TACTTACATA	66CGTTACCC CCGCAATGGG	770 TITGCCTGGT AAACGGACCA	TACACCAACG	1010 CGAATTATTT GCTTAATAAA	1130 TGTTTTTGGG ACAAAAACCC	Cacal 1161464101 AACATCTAGA
CGCCTGCTGG GCGGACGACC	160 ACGCAAACCG TGCGTTTGGC	280 66CACCCCAG CC6TGGGGTC	400 AACABKAAAA TIGTITITI	TCTAAGGAAA AGATTECTTT	660 660 661 661 661	Hazi	880 TGCGCCCATC ACGCGGGTAG	1000 ABBCCABACG TCCGGTCTGC	1120 ACAATCTTCC TGTTAGAAGG	1240 CTBA FAGCCT 64CTATCGGA
30 ACAGGATTTT TGTCCTAAAA		250 ACC TCACTCATTA TGG AGTGAGTAAT	SBO KEEK 390 CCG GATCECGAGT GGC CTAGGGCTCA	TCAATTGTTA AGTTAACAAT	630 67CGTGACTG CAGCACTGAC	750 GCCTGAATGG CGGACTTACC	870 ACGGTTACGA TGCCAATGCT	990 GGCTACAGGA CCGATGTCCT	1110 ATTTGCTTAT TAAACGAATA	1230 4660441640 1006114016
CCACCAT	130 BTGAAABAA AAACCACCT CACTITICTT TITGGTGBGA	250 260 260 260 270 280 290 300 310 Re 222 330 360 360 350 360 350 360 350 360 360 350 360 360 350 360 360 360 360 360 360 360 360 360 36	370 E-c-RI 380 K*** 390 TAC GAATICCCG GATCECGAT ATG CTTAAGGGG CTAGGGCTCA	ANTIANTICS ANGENTES TO TO TOTAGO STATE TO THE STATE OF THE STATE OF THE STATE OF THE SHAPE SHAPE SHAPE SHAPE SOFTEN CONTINUES OF THE STATE OF THE ST	610 620 620 630 640 650 650 650 650 660 670 670 680 680 670 680 700 700 700 710 67450 700 710 67450 710 67450 710 67450 710 67450 710 67450 710 67450 710 710 710 710 710 710 710 710 710 71	730 780 890 810 820 820 CCCTTCCCAA CAGTICGOT TROCCTOR TITCCGGCACC AGAAGCGGTG CCGGAAAGT GGCTGGAGTG CGATCTTCCT GAGGCCGAAGGTG CCGGAAAGT GGCTGGAGTG CGATCTTCCT GAGGCCGAAGGTG CCGGAAAGGT GCAACAGGTG CGATCTTCCT GAGGCCGAAGGT GTAAGAGGA CTCCGGCTATACA GGCTAAGAAGGA CTCCGGCTATACA GGCTAAGAAGGA CTCCGGCTATACA GGCTAAGAAGGA CTCCGGCTATACA GGCTAAGAAGGA CTCCGGCTATACA GGCTAAGAAGGA CTCCGGCTATACA GGCTAAGAAGGA CTCCGGCTATACA GGCTATACA GGCTAAGAAGGA CTCCGGCTATACA GGCTATACAAGGA CTCCGGCTATACAAGGA CTCCGGCTATACAAGAAGA GGCTATACAAGAAGAAGA GGCTATACAAGAAGAAGAAGAAGAAAGAAAGAAAGAAAGA	360 160 166	980 1050 1060 1070 1070 1070 1070 1070 1070 107	1000 Flaacsiita caaittaaat Aattgcaaai biiraaitta	1220 1230 1230 1230 1230 1230 1230 1250 1250 1250 1250 1260 1250 1260 1260 1260 1260 1260 1260 1260 126
GATTTCGGAA CTAAAGCGTT	130 GTGAAAGAA CACTTTTCTT	250 CGCAATTAAT GTGAGTTA GCGTTAATTA CACTCAAT	370 CCATGATTAC GGTACTAATG	490 ATTTATTGC TAATAAACG	610 ACTGGCCGTC TGACCGGCAG	730 CCCTTCCCAA GGGAAGGGTT	CCCCTCAAAC TGGCAGA'GGGGGGGGTTTG ACCGTCT	970 ATTTAATGTT TAAATFACAA	1090 1100 1110 1110 1120 1120 1130 1150 1150 1150 1160 1170 1180 1190 1190 1190 1190 1190 1190 119	CTTGTTTGCT GAACAAACGA
		EE!!	11 1 17	D= 0	ت ته د مانات	21.30	ene:	u T		(

F16_3







cD.	
- 5	
~	
>	
3	
-	
æ	
9	
ပ	
_	
Ç	
_	
ပ	
_	
_	
•	
•	
_	
<u></u>	
Ċ	
3	
ĕ	
2	
=	
=	
\overline{a}	
_	
_	
-	
Ç	
•	
⋖	
9	
ဖ	
9	
9	
ق	
9	
ق	
ق	
5	
ñ	
×	
ě	
Œ	

16 AAA TAT ACA AGT TAT ACT TIG GCT TIT CAG CTC TEC ATC GTT TEG GGT TCT CTT GEC TGT TGC CAG GAC CCA TAT GTA AAA 17 Lys Tyr Thr Ser Tyr Tie Leu Als Phe Gin Leu Cys Iie Vel Leu Gly Ser Leu Gly Cys Tyr Cys Gin Asp Pro Tyr Vel Lys 18 John Ash CTT AAG AAA TAT TTT AAT GCA GGT CAT TCA GAT GTA GCG GAT AAT GGA ACT CTT TTC TTA GGC ATT TTG AAG AAT TTG 18 GAA AAC CTT AAG AAA ATA ATG CAG AGC CAT TCA GAT GTA GCG GAT AAT GGA ACT CTT TAT TAAA AAC TTT AAA AAA TTA ATG CAG AAC ATT GTC CCT TTT TA AAA ATT ATG CAG AAC ATT GTC CCT TTT TA AAA ATT ATG CAG AAC ATT GTC CCT TTT TA AAA ATT ATG CAG AAC ATT GTC CCT TTT TAC TTC AAA ATT ATG CAG AAC ATT GTC CCT TTT TAC TTC AAA CTT TTA AAA AAC TTT AAA AAT ATG CAG AAC ATT GTC CCT TTT TTC GAT AAAG TTT AAA AAC TTT AAA AAC TTT AAA AAC TTT AAA AAT AAT							•	وب	
43 416 416 416 417 418 419 419 419 419 419 419 419	6AA 61u	AAA Lys	CAA 61n	AAT	666 61y	¥¥	ATGT	CTAA	
413 416 AAA TAT ACCA AGT TAT ACC TTG GCT TTT CAG CTC TGC ATC GTT TTG GGT TCT GGC TGT TGC CAG GAC CCA TAT GTA ATG AAA TAT ACCA AGT TAT ATC TTG GCT TTT CAG CTC TGC GTT TTG GGT ATG CAG GAT CTT TAT GCG GGT CAT TTG AGG AAT ALS GLA AAA ATA ATG CAG GGT CAT TCG GAT GTT CAG AAT GTT TTT TTA GGC ATT TTG AAG AAT ALS GLA AAA ATA ATG CAG AGC CAT ATG CTC TTT TATA AAA ATTA GCAG AGC CAG AGC GLA ATT GTC CAT TTC CAAA CTT TTA AAA AAC TTT AAA AAC CAG AGC GAG GAG GAG GAG GAG GAG	AAA Lys	166 1rp	ATC 11.	ACT	ACA Thr	101	ATAT	CAAC	
413 416 416 416 416 416 417 418 416 417 416 418 416 417 418 416 418 418 418 418 418 418 418 418 418 418	61A Vel	AAT ABn	AGC	CT6 Leu	AAA Lys	AAA	ATTA	CAGC	
43 416 416 416 416 416 416 416 4	IAT	AAG Lys	CA6	AA6 Lys	6CT A18	111	ATCT	TA66	
43 415 42 AAA TAT ACA AGT TAT CTG GCT TIT CAG CTC TGC ATC GTT TG GGT TCT CTT GGC TGT TAC CAG GAC Het Lys Tyr Thr Ser Tyr Ile Leu Ala Phe Gin Leu Cys Ile Val Leu 41y Ser Leu G1y Cys Tyr Cys Gin Asp 133 626 GAA AAC CTT AAG AAA TAT TTT AAT GCA GAG CAT TCA GAT GTA GGG GAT AAT GGA ACT CTT TTA GGA TTT Ala Giu Aan Leu Lys Lys Tyr Phe Aan Ala G1y His Ser Asp Val Ala 4sp Aan G1y Thr Lau Phe Lu Phe Leu G1y Ile 223 626 GAG AGT GAC AGA AAA TAT GCA ACC CAA ATT GTC CTTT TAC TTC AAA ACT TTT AAA AAC TTT TAT AAA AAC TTT AAA AAC TTTT AAA AAC TTTT AAA AAC TTT AAA AAC TTTT AAA AAC TTT AAA AAC TTTT AAA AAC TTTT AAA AAC AAC	CCA Pro	116 Leu	GAC Asp	6AA 61u	6CA A18	AAT	SAAT	SAAC	
43 416 42 AAA TAI ACA AGT TAI ATC TIG GCT TIT CAG CTC TGC ATC GTT TIG GGT TCT GGC TGT TAC CAG Het Lys Tyr Thr Ser Tyr Ile Leu Ala Phe Gin Leu Cys Iie Val Leu 619 Ser Leu Gly Cys Tyr Cys Gin 133 5CA AAAC CTT AAG AAA TAT TTT AAT GCA GGT CAT TCA GAT GTA GCG GAT AAT GGA ACT CTT TTT TAA 418 GIU Asn Leu Lys Lys Tyr Phe Asn AIB GLY His Ser Asp Val AIB Asp Asn Gly Thr Leu Phe Leu Gly 223 6A6 GAG AGT GAC AGA AAA ATA ATG CAG AGC CAA ATT GTC TCC TTT TAC TTC AAA CTT TTT AAA AAC TTT AAA 610 GIU Ser Asp Arg Lys Tyr Phe Asn AIB GLY His Ser Asp Val AIB Asp Asn GLY Thr Leu Phe Lys Asn Phe Lys 313 AAG AGT GGG AGC ACC ACC AGG AAA ATG AGC AAT GTC TCC TTT TAC TTC AAA CTT TTT AAA AAC TTT AAA 403 AAG AGT GGG AAA AGG AGC ACC AGG AAA GCA ATA CAT GAA TTT TT GAT AGC AAA AAG AAA AGG AAT GAT GAT AAG AGT GGG AAA AGG AGC ACC AGG AAA GCA ATA CAT GAA GTC ATC CAA ATG GTG AGG AAG CGA AAA AGG AGT CAA GGA AGG AAA GCA ATA CAT GAA GTC ATC CAA GTG ATG GTG AGG AAG CGA AAA AGG AGT CAA AGG AAA GCA ATA CAT GAA GCA TTC CAA GTG ATG GTG AGG TAC ATG	6AC Asp	AT1 11•	GAT	TTC	CCA Pro	911	AAATO	2999	
43 416 416 416 417 418 419 419 419 419 419 419 419	CA6 61 n	66c 61y	AAA Lys	GAC	106 Ser	TAT	TGA.	rcagi	
43 416 416 417 418 419 410 410 411 411 412 413 413 413 413 413	16c	11 A	T T T	GAT Asp	CT6	CAA	673 [61A/	793 FATC	
43 416 416 417 418 419 410 410 410 410 410 411 411	TAC Tyr	77 C	AAC	CGA Arg	6AA 61u	513	11161	SCTT	
A15 A16 AAA TAT ACA AGT TAT ATC TTG GCT TTT CAG CTC TGC ATC GTT TTG GGT TCT CTT GGC Het Lys Tyr Thr Ser Tyr Ile Leu Alm Phe Gin Leu Cys Ile Vel Leu Gly Ser Leu Gly 133 GCA GAA AAC CTT AAG AAA TAT TTT AAT GCA GGT CAT TCA GAT GTA GCG GAT AAT GGA ACT Alm Glu Asn Leu Lys Lys Tyr Phe Am Alm Gly His Ser Amp Vel Alm 4mp Am Gly Thr 223 GAG GAG AGT GAC AAA ATA ATG CAG AGC CAA ATT GTC TCC TTT TAC TTC AAA GTY Thre Glu Glu Ser Amp Arg Lys Ile Het Gin Ser Gin Ile Val Ser Phe Tyr Phe Lys Lu Phe 313 AAG AGT GTG GAG ACC ATC AAG GAA GAC ATG AAT GTC TCC TTT TAC TTC AAA CTT TTT 610 GLU Ser Amp Arg Lys Ile Het Gin Ser Gin Ile Val Ser Phe Tyr Phe Lys Lu Phe 113 AAG GAG AGT GAG ACC ATC AAG GAA GAC ATG AAT GTC TCC TTT TTC GAT AGC AAA AAG 149 AAG CGA AAA AGG AGT CAA GAA GAA GCA ATA CAT GAA GTC ATC CAA GTG ATG 149 AAG CGA AAA AGG AGT CAA GTC CAA GGT CAAA GCA ATA CAT GAT CAT CAT CAA GTG ATG 149 AAG CGA AAA AGG AGT CAG ATG CTG TTT CAA GGT CCAG TAA TGG TTG TCC AAG CAA AAGG AGT CAG ATG CTG TTT CAA GGT CCAG TAA TGG TTG TCC AAG CAG AAA AGG AGT CAG ATG CTG TTT CAA GGT CCAG TAA TGG TTG TCC AAG CAG AAA AGG AGT CAG ATG CTG TTT CAA GGT CCAG TAA TGG TTG TCC AAG CAG AAA AGG AGT CAG ATG CTG TTT CAA GGT CCAG TAA TGG TTG TCC AAG CAG AAA AGG AGT CAG ATG CTG TTT CAA GGT CCAG TAA TGG TTG TCC AAG CAG AAA AGG AGT CAG ATG CTG TTT CAA GGT CCAG TAA TGG TTG TCC AAG CAG AAA AGG AGT CAG ATG CTG TTT CAA GGT CCAG TAA TGG TTG TCC AAG CAG AAA AGG AGT CAG ATG CTG TTT CAA GGT CCAG TAA TGG TTG TCC AAG CAG AAA AGG AGT CAG ATG CTG TTT CAA GGT CCAG TAA TGG TTG TCC AAG CAG AAA AGG AGT CAG ATG CTG TTT TATTATATATATATATATATATATATATATATA	13 161 Cys	CTT CTT	AAA Lys	AAA Lys	3 6CT A1e	;3 T6C	VACTI) AAG	
43 A16 A26 A27 A16 A28 A16 A28 A28 A39 A39 A39 A39 A39 A39 A39 A3	10 660 61y	ACT Thr	28 111 Phe	AA6 Lys	ATG Het	201	V96CV	TTAG	
43 415 416 417 418 419 419 419 419 419 419 419	CTT	66A 61y	CT1	AAA	616	116	ITAN	1616/	
43 415 416 416 417 418 416 419 419 419 419 419 419 419	101 Ser	A A T	AAA Lys	AAC	CAA 61n	166	1111	SCTAI	
43 415 416 416 417 418 419 419 419 419 419 419 419	66T	6A1	1 t c	AGC Ser	ATC 11.	TAA #	4A6T/	CAA6	
43 415 416 417 418 419 419 419 419 419 419 419	176 Leu	606 A14	TAC	6AT Asp	010 Lea	6.1n	43 AAAT/	53 TA66(
43 A16 AAA TAT ACA AGT TAT ATC TTG GCT TTT CAG CTC TGC ATC Het Lys Tyr Thr Ser Tyr IIe Leu Ale Phe Gin Leu Cys IIe 133 6CA GAA AAC CTT AAG AAA TAT TTT AAT GCA GGT CAT TCA GAT A1e Giu Asn Leu Lys Lys Tyr Phe Asn Aie Gly His Ser Asp 223 6AG GAG AGT GAC AGA AAA ATA ATG CAG AGC CAA ATT GTC TCC 61u Giu Ser Asp Arg Lys IIe Het Gin Ser Gin IIe Vel Ser 313 AAG AGT GTG GAG ACC ATC AAG GAA GAA ATT GTC TCC 61u Giu Ser Asp Arg Lys IIe Het Gin Ser Gin IIe Vel Ser 117 AAG AGT GTG GAG ACC ATC AAG GAA GAA GAA TATT AAG AGT GTG GAG ACC ATC AAG GAA GAA ATA CAT 177 187 AAG CGA AAA AGG AGT CAG TG CAA CGC AAA GCA ATA CAT 187 AAG CGA AAA AGG AGT CAG ATG CTC CAA CGC AAA GCA ATA CAT 187 AAG CGA AAA AGG AGT CAG ATG CTC CAA CGC AAA GCA ATA CAT 187 AAG CGA AAA AGG AGT CAG ATG CTC TTC AAG GTC AAA GCA Lys Arg Lys Arg Ser Gin Het Leu Phe Gin Gly Arg Arg Alm 583 TCTATTTATAAATTCTAAACATTATTATAGGGGAATATTTTTAGACTCATC 703 TTATTTATAAATTCTAAACATTATTATATGGGGAATATTTTTAGACTCATCA AAA TTATTTATAAATTCTAAACTTATTATATGGGGAATATTTTTAGACTCATCA AAA TTATTTATAAATTCTAAACTTATATGGTGCTCACTTAATCCTTTGTTTTTTGGACT AAA AAA	611 Ve1	61A Val	1 4 4 4 4 4 4 4 4 4 4 4 4 4 4 4 4 4 4 4	Ph.	GAA Glu	100 501	NATC/	76 FAAT	ě
43 A16 AAA TAI ACA AGI TAI ATC TIG GCT TTT CAG CTC TGC Het Lys Tyr Thr Ser Tyr lie Leu Ale Phe Gin Leu Cys 133 GCA GAA AAC CTT AAG AAA TAI TIT AAI GCA GGI CAI TCA Ale Glu Asn Leu Lys Lys Tyr Phe Asn Ale Gly His Ser 253 GAG GAG AGI GAC AGA AAA ATA ATG CAG AGC CAA ATT GTC Glu Glu Ser Asp Arg Lys Ile Het Gln Ser Gln Ile Val 313 AAG AGI GTG GAG ACC ATC AAG GAC ATG AAT GTC Lys Ser Val Glu Thr Ile Lys Glu Asp Het Asn Vel Lys AAG GAA AAA AGG ACC TTG AAI GTC CAA GCC AAA Tyr Ser Val Thr Asp Leu Asn Vel Gln Arg Lys Ale Ile 493 AAG CGA AAA AGG AGT CAG CTG TTT CAA GGT CGA AGA Lys Arg Lys Arg Ser Gln Het Leu Phe Gln Gly Arg Arg 583 TCTATTTATAATTTAACATTATTAATTTATGGGGAATATTTTTAGACTT 703 TTATTTATAATTCTATATCTATATGCTGTGCTCTAATCCTTTGTTTTCT 703 TTATTTATAATTCTATATCTTATATGTGTGTCTTTGTTTTTTTT	ATC 11•	6AT Asp	TCC Ser	T H	CAT H18	6CA A18	ATC.	[6AC]	
43 A16 AAA TAT ACA AGT TAT ATC TTG GCT TTT CAG CTC Met Lys Tyr Thr Ser Tyr Ile Leu Alm Phe Gin Leu 133 GCA GAA AAC CTT AAG AAA TAT TTT AAT GCA GGT CAT A18 Giu Asn Leu Lys Lys Tyr Phe Asn Aim 61y His 223 GAG GAG AGT GAC AGA AAA ATA ATG CAG AGC CAA ATT Glu Glu Ser Asp Arg Lys Tyr Phe Asn Aim 61y His 313 AAG GAG AGT GAC AGA AAA ATA ATG CAG AGC CAA ATT AAG AGT GTG GAC ACC ATC AAG GAA GAC ATG AAT GTC Lys Ser Val Glu Thr Ile Lys Glu Asp Met Asn Val 1yr Ser Val Glu Thr Ile Lys Glu Asp Met Asn Val 1yr Ser Val Thr Asp Leu Asn Val Gln Arg Lys Alm 493 AAG CGA AAA AGG AGT CAG ATG CTG TTT CAA GGT CGA Lys Arg Lys Arg Ser Gln Met Leu Phe Gln Gly Arg 523 AAG CGA AAA AGG AGT CAG ATG CTG TTT CAA GGT CGA Lys Arg Lys Arg Ser Gln Met Leu Phe Gln Gly Arg 523 TCTATTTATAAATTCCTATATATATATATGGGGAATATATTTTTATATATA	16c Cys	TCA	61C Val	AA6 Lys	ATA 11e	A6A Arg	SACTO	rrc	
43 A16 AAA TAT ACA AGT TAT ATC TTG GCT TTT CAG Het Lys Tyr Thr Ser Tyr IIe Leu Ale Phe GIn 133 GCA GAA AAC CTT AAG AAA TAT TTT AAT GCA GGT A18 GIU Asn Leu Lys Lys Tyr Phe Asn A18 GIY 223 GAG GAG AGT GAC AGA AAA ATA ATG CAG AGC CAA GLU GLU Ser Asp Arg Lys IIe Het GIn Ser GIn 313 AAG GGT GTG GAG ACC ATC AAG GAA GAC ATG AAT Lys Ser Val GIU Thr IIe Lys GIU Asp Het Asn 403 TAT TCG GTA ACT GAC TTG AAT GTC CAA GGT Lys Ser Val Thr Asp Leu Asn Vel GIn Arg Lys 493 AAG CGA AAA AGG AGT CAG ATG CTG TTT CAA GGT Lys Arg Lys Arg Ser GIn Het Leu Phe GIn GIY 583 TCTATTATATAATTCTATAACATTATTATATGGGGAATATTTT 703 TTATTTATATAATTCCTATATCCTGTGACTGACCCTT 613	010 Leu	CAT H15	ATT Ile	61C Val	6CA Ala	CGA Arg	TTA	11611	
43 415 416 416 417 418 419 419 419 419 419 419 419	3 CA6 61n	3 661 61y	CAA 61n	AAT ABD	AAA Lys	13 66T 61y	ATT	122	
43 416 AAA TAT ACA AGT TAT ATC TTG 6CT Het Lys Tyr Thr Ser Tyr Ile Leu Ale 133 6CA 6AA AAC CTT AAG AAA TAT TTT AAT 418 61u Asn Leu Lys Lys Tyr Phe Asn 223 6A6 6A6 AGT 6AC AGA AAA ATA ATG CAG 61u 61u 5er Asp Arg Lys Ile Het 61n 313 AA6 AGT GTG 6AG ACC ATC AAG 6AA 6AC Lys Ser Val 61u Thr Ile Lys 61u Asp 403 TAT TCG 6TA ACT 6AC TTG AAT GTC CAA Tyr Ser Val 7hr Asp Leu Asn Val 61n 493 AAG CGA AAA AGG AGT CAG ATG CTG TTT Lys Arg Lys Arg Ser 61n Met Leu Phe 583 TCTATTATATAATTCCTATATCTGTGGGGTGCCCAC 703 TTATTTATAATTCCTATATCCTGTGGGGTGCCCAC	. T T P	16 6CA A 18	25 AGC Ser	ATG Met	600 Arg	CAA G1n	AATAI	FTAAT	
43 415 A16 A24 A16 A24 A25 A37 A33 GCA GAA AAC GTT A38 GAG AAC GTT AAA AAA AAA AAA AAA	6C1	AAT	CAG 61n	6AC Asp	CAA Gln	T b	9999	TCAC	
43 ATG AAA TAT ACA AGT TAT ATC Het Lys Tyr Thr Ser Tyr Ile 133 GCA GAA AAC CTT AAG AAA TAT Ale Glu Asn Leu Lys Lys Tyr 223 GAG GAG AGT GAC AGA AAA ATA Glu Glu Ser Asp Arg Lys Ile 133 AAG AGT GTG GAG ACC ATC AAG AAG AGT GTG GAC TTG AAT TAT TCG GTA ACT GAC TTG AAT Tyr Ser Val Glu Thr Ile Lys AAG CGA AAA AGG AGT CAG ATG Lys Arg Lys Arg Ser Gln Het 583 TCTATTTATAATATTTAACATTTTTA 703 TTATTTATAATATTCCTATATCCTGTGAC	116 Leu	111 Ph•	ATG Het	6AA 61u	61C Val	C16 L•u	613 4TAT	733 1610	9
43 416 AAA TAT ACA AGT TAT Het Lys Tyr Thr Ser Tyr 133 6CA GAA AAC CTT AAG AAA Ale Glu Asn Leu Lys Lys CAG GAG AGT GAC AAA Glu Glu Ser Asp Arg Lys 313 AAG GAG AGT GGA ACC ATC Lys Ser Val Glu Thr Ile Tyr Ser Val Glu Thr Ile Tyr Ser Val Thr Asp Leu 493 AAG CGA AAA AGG AGT CAG Lys Arg Lys Arg Ser Gln 583 TCTATTTATTAATATTTAACATT 703 TTATTTATAATTCCTATTCCTG	ATC 11e	141	ATA 11e	AAGLYS	AAT	AT6 Met	ATTT/	r6AC.	
43 A16 AAA TAT ACA A6T Het Lys Tyr Thr Ser 133 6CA GAA AAC CIT AAG A18 61u Asn Leu Lys 61u 61u Ser Asp Arg 133 AA6 A67 676 6A6 ACC Lys Ser Val Glu Thr 403 AA6 CGA AAA A66 A6T Lys Ser Val Thr Asp 493 AA6 CGA AAA A66 A6T Tyr Ser Val Thr Asp 283 AA6 CGA AAA A66 A6T Tyr Ser Val Thr Asp 293 AA6 CGA AAA A66 A6T Tyr Ser Val Thr Asp 293 AA70 TYTATTATATATATTAATTCTAATT	1A1 1yr	AAA	AAA Lys	ATC Ile	176 Leu	CA6 61n	SATT/	00.00	
43 416 AAA TAI ACA Het Lys Tyr Thr 133 6CA GAA AAC CIT Ala Glu Asn Leu 223 6A6 GAG AGI GAC 61u Glu Ser Asp 313 AAG AGI GIG Lys Ser Val Glu 403 TAT TC6 GTA ACI Tyr Ser Val Thr 493 AAG CGA AAA AGG Lys Arg Lys Arg 583 TCATTTATTAATATI	AGT Ser	AAG	AGA	ACC	6AC Asp	AGT.	TAAC	ITATO	
43 A16 AAA TAT Het Lys Tyr 133 GCA GAA AAC A18 G1u Ser 313 AAG AGT GTG Lys Ser Val 1yr Ser			6AC Asp	6A6 61u	ACT		LTATI	1001	
43 ATG AAA Met Lys 133 GCA GAA Als Glu 223 GAG GAG Glu Glu 313 AAG AGT Lys Ser 17r Ser 493 AAG CGA Lys Arg 583 TCTATTTAT	1A1 1y1	AAC	AGT Ser	616 Val	61 A Ve 1	AAA Lys	LTTA	AATI	
43 ATG Met 133 6CA A18 223 6GU 313 AAG LYS 107 107 107 107 107 108 108 108 108 108 108 108 108 108 108	AAA	6 A A	6A6 61u	AGT Ser	106 Ser	CGA Arg	1117	TTAI	
	43 ATG Met	133 6CA Alm	(0 3	co us		(2 18	583 TCT#	703 TA1	• 23

1903 1933 AATGGCATGTCAGACAGAACTTGAATGTGTGAGGTGAACATGAAACATAGCATCTCAGGAGATTTCATGCCTGGTGCTTCCAAATATTGTTGACAACTGTGACTGTACCCAAATGG

1093

943

1063

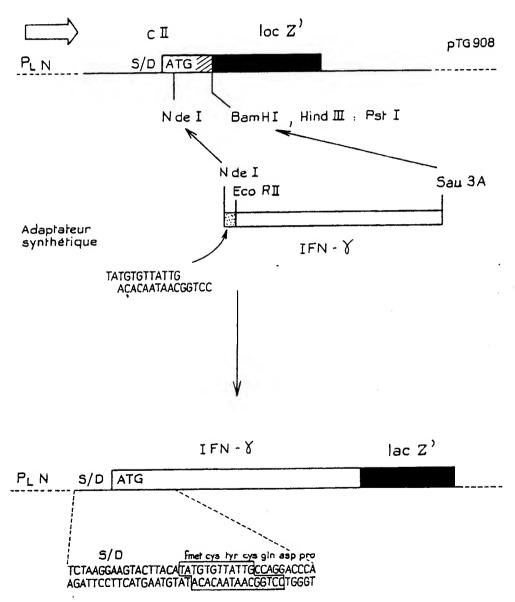
1123

823 CAAGATCCCATGGGTTGTGTGTTTTTTTCACTTGATGAACACTTATAAGTGAAGTGATACTATCCAGTTACTGCCGGTTTGAAAATATGCCTGCAATCTGAGCCAGTGCTTT

OMPI WIPO

6/8

CONSTRUCTION DE PTG909





7/8

CONSTRUCTION DE PTG941

PTG909

IFN

MetCysTyrCysGlnAspProTyr
TAAGGAAGTACTTACATATGTGTTATTGCCAGGACC<u>CATATG</u>....

NDEI

NDEI

NDEI

TATGTGČTACTGŤCAGGAŤCCČ ACACGATGACAGTCCTAGGGAT

IFN

PTG941

MetCysTyrCysGlnAspProTyr

 ${\tt TAAGGAAGTACTTA} \underline{{\tt CATATG}} {\tt TGCTACTGTCA} \underline{{\tt GGATCC}} {\tt CTAT}$

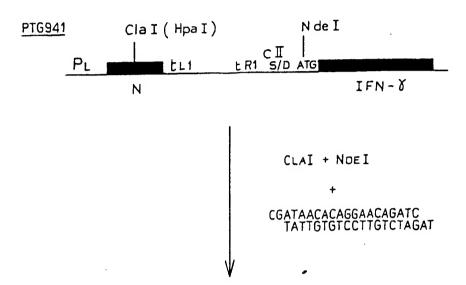
NDEI BAMHI

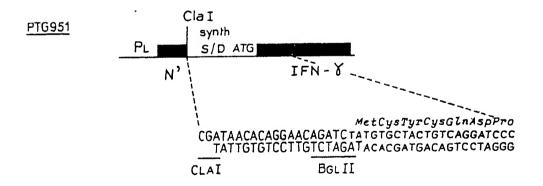
FIG₋7



8/8

CONSTRUCTION DE PTG951





FIG_8



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

international Application No PCT/FR 84/00287

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (If several classification symbols apply, indicate all) *

According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC Int.Cl.4 C 12 N 15/00; C 12 P 21/02; C 12 N 1/20 // (C 12 N 1/20; C 12 R 1/19)

II. FIELDS SEARCHED

Minimum Documentation Searched 4

	Minimum Documentation Conference
Classification System	Classification Symbols
Int.Cl.4	C 12 N

Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are included in the Fields Searched 9

 	COMBIDERS	TO	BF	RELEVANT 14

Category *	Citation of Document, 16 with indication, where appropriate, of the relevant passages 17	Relevant to Claim No. 18
Y	EP, A, 0089676 (TAKEDA CHEMICAL IND.) 28 September 1983, see claims 1,3,5,6,8-20; page 4	1
Y A	EP, A, 0094887 (TRANSGENE) 23 November 1983, see claims 1-23	1-3,6 4,7-11
Y	EP, A, 0095350 (TANAKA) 30 November 1983, see claims 1-20	1,2
A	EP, A, 0041767 (BIOGEN) 16 December 1981, see claims 1-17	1,2.
A	Gene, volume 13, 1981, Elsevier/North—Holland Biomedical Press; A. Honigman et al.: "Plasmid vectors for positive selection of DNA inserts controlled by the lambda rho L promoter, repressor and antitermination function", pages 289—298, see the whole document	1,2
P,Y	EP, A, 0099084 (HOFFMANN-LA ROCHE) 25 January 1984, see claims 1-30	1,2,3,6
P,Y	EP, A, 0110044 (TAKEDA CHEMICAL IND.) 13 June 1984, see claims 1-15	- 1,2

- * Special categories of cited documents: 16
- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" learlier document but published on or after the international filling date
- "L" document which may throw doubte on priority claim(s) or which is cited to eatibilish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention.
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

INTERNATIONAL APPLICATION NO. PCT/FR 84/00287 (SA 8357)

This Annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The members are as contained in the European Patent Office EDP file on 22/03/85

The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent document cited in search report	Publication date	Patent fa member	-	Publication date
EP-A- 0089676	28/09/83	AU-A-	1274483	29/09/83
EP-A- 0094887	23/11/83	FR-A- WO-A-	2526661 8304052	18/11/83 24/11/83
EP-A- 0095350	30/11/83	AU-A-	1482483	08/12/83
EP-A- 0041767	16/12/81	EP-A- JP-A- AU-A- EP-A- AU-A-	0041313 57014599 6897881 0040922 7045581	09/12/81 25/01/82 10/12/81 02/12/81 10/12/81
EP-A- 0099084	25/01/84	JP-A-	59028479	15/02/84
EP-A- 0110044	13/06/84	WO-A-	8402129	07/06/84

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demende internationale N° PCT/FR 84/00287

I. CLASSEMENT DE L'INVENTION (si plusieurs symboles de classification sont applicebles, les indiquer tous) 7					
Seion la classification internationale des brevets (CIS) ou à la fois e 4 C 12 N 15/00; C 12 P 21/0	Seion la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois seion la classification nationale et la CIB 4 C 12 N 15/00; C 12 P 21/02; C 12 N 1/20 // (C 12 N 1/20; CIB : C 12 R 1/19)				
II. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTI					
	inimale consultée ⁸				
Système de classification	Symboles de clessification				
CIB ⁴ C 12 N					
Documentation consultée autre que la où de tels documents font partie des do	documentation minimale dans la mesure maines sur lesquels le recherche a ροπό °				
III. DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS 10 Identification des documents cités, 19 ave	ec indication, si nécessairs, N° des revendications				
Catégorie des passages pertin					
Y EP, A, 0089676 (TAKEDA C 28 septembre 1983, vo 1,3,5,6,8-20; page 4	ir revendications if				
Y EP, A, 0094887 (TRANSGEN voir revendications 1	-23				
A	4,7-11				
Y EP, A, 0095350 (TANAKA) voir revendications 1	30 novembre 1983, -20 1,2				
A EP, A, 0041767 (BIOGEN) voir revendications 1	16 décembre 1981, -17 1,2				
A Gene, volume 13, 1981, E Holland Biomedical Pr et al.: "Plasmid vect selection of DNA inse the lambda rho L prom antitermination funct voir le document en e	ress; A. Honigman cors for positive erts controlled by moter, repressor and cion", pages 289-298,				
 Catégories spéciales de documents cités: ¹¹ x A > document définissant l'étet générel de la technique, non considéré comme particulièrement perinent x E > document antérieur, meis publié à la date de dépôt international ou a plas cette date x L > document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la det de de publication d'une autre citation ou pour une raison apéciale (taile qu'indiquée) x D > document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne partie être considérée comme impliquent une activité inventive x > document particulièrement pour la bass de l'invention revendiquée ne partie être considérée comme impliquent une activité inventive x > document particulièrement pour la bass de l'invention revendiquée ne partie être considérée comme impliquent une activité inventive x > document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne partie être considérée comme impliquent une activité inventive x > document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne partie être considérée comme impliquent une activité inventive x > document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne partie être considérée comme impliquent une activité inventive x > document particulièrement pertinent l'envention revendiquée ne partie être considérée comme impliquent une activité inventive x > document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne partie être considérée comme impliquent une activité inventive x > document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne partie être considérée comme impliquent une activité inventive x > document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne partie être considérée comme impliquent une activité inventive x > document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée en partie être considérée comme m					
Dete à lequelle le recherche internationale e été effectivement achevée 11 mars 1985	Date d'expédition du présent repport de fecharine internationale 0 1 AVR, 1985				
Administration chargée de la recherche internationale OFFICE EUROPEEN DES BREVETS	Signature du fonctionnaire autorisé G. L. M. Kruydenberg				

III. DOCU	III. DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS 14 (SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDIQUÉS SUR LA DEUXIÈME FEUILLE)				
Catégorie *	identification des documents cités, ¹⁶ avec indication, si nécessaire des passages pertinents ¹⁷	N° des revendications visées 18			
Р,Ұ	EP, A, 0099084 (HOFFMANN-LA ROCHE) 25 janvier 1984, voir revendications 1-30	1,2,3,6			
P,Y	EP, A, 0110044 (TAKEDA CHEMICAL IND.) 13 juin 1984, voir revendications 1-15	1,2			

A LA DEMANDE INTERNATIONALE NO. PCT/FR 84/00287 (SA 8357)

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche international visé ci-dessus. Lesdits membres sont ceux contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du 22/03/85

Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets.

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevets		Date de publication
EP-A- 0089676	28/09/83	AU-A-	1274483	29/09/83
EP-A- 0094887	23/11/83	FR-A- WO-A-	2526661 8304052	18/11/83 24/11/83
EP-A- 0095350	30/11/83	AU-A-	1482483	08/12/83
EP-A- 0041767	16/12/81	EP-A- JP-A- AU-A- EP-A- AU-A-	0041313 57014599 6897881 0040922 7045581	09/12/81 25/01/82 10/12/81 02/12/81 10/12/81
EP-A- 0099084	25/01/84	JP-A-	59028479	15/02/84
EP-A- 0110044	13/06/84	WO-A-	8402129	07/06/84

Pour tout renseignement concernant cette annexe : voir Journal Officiel de l'Office européen des brevets, No. 12/82